

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



**Ivana KOPECKÁ**

Využití stabilních izotopů k určení geografického původu obchodovatelných ohrožených druhů  
živočichů a rostlin

Application of stable isotope techniques for verifying the geographical origin of endangered  
plants and animals subject to international trade

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel:

Mgr. Kateřina Jandová, Ph.D.

Praha 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala pod vedením vedoucí bakalářské práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Tištěná verze práce je shodná s elektronickou verzí vloženou v SIS.

V Praze, 13. 8. 2018

.....

Podpis

## Abstrakt

Prvky se v přírodě mohou vyskytovat v několika modifikacích, které se od sebe liší množstvím neutronů v jádře. Tyto modifikace se jmenují izotopy. Neutrony mají sice neutrální náboj, ale nemají nulovou hmotnost, proto se izotopy jednoho prvku liší hmotností. Díky citlivým analytickým metodám můžeme rozeznat, který izotop je ve vzorku obsažen v jakém množství (využívá se hmotnostní spektrometrie, ze které se získává poměr stabilních izotopů ve vzorku). Toho lze využít v mnoha oborech, například v geologii, potravní ekologii, nebo zjišťování geografického původu živočichů. Cílem bakalářské práce je v publikované literatuře zjistit, do jaké míry je metoda analýzy stabilních izotopů využitelná pro určení geografického původu obchodovatelných chráněných druhů rostlin a živočichů, především pak želv rodu *Testudo*. Želvy rodu *Testudo* jsou chráněné Úmluvou CITES, která omezuje, povoluje a zakazuje obchodování s ohroženými druhy tak, aby nedocházelo k jejich vymírání způsobeným nadměrným využíváním pro komerční účely. Stále však dochází k nelegálnímu obchodu, který se snaží dohlížející orgány odhalovat a potírat.

**Klíčová slova:** sledovatelnost, určení původu, ověření pravosti, úmluva CITES

## **Abstract**

Elements in nature can exist in several versions, which differ in the amount of neutrons in the nucleus. These modifications are called isotopes. Neutrons have a neutral charge, but do not have a zero weight, therefore isotopes of a single element are different in weight. Thanks to the sensitive analytical methods, we can discern that the isotope in the sample is contained in what quantity (mass spectrometry is used, from which to retrieve the ratio of stable isotopes in a sample). This can be used in many fields, such as in geology, food ecology, or discovery of geographic origin. The aim of the thesis is in the published literature to determine the extent to which the method of analysis of stable isotopes is usable to verify the geographical origin of endangered species of flora and fauna subject to international trade, especially turtles of the genus *Testudo*. Turtles of the genus *Testudo* are protected by CITES treaty, which limits, enables and disables trading in endangered species so as to avoid their extinction caused overexploitation for commercial purpose. However, there is still an illegal trade that the supervising authorities are trying to detect and combat.

**Key words:** traceability, provenance determination, authentication, CITES treaty

## Obsah

1. Úvod .....	7
1.1. Cíle práce.....	7
2. Stabilní izotopy .....	8
2.1. Hmotnostní spektrometrie .....	9
2.2. Frakcionace, míchání.....	11
2.3. Koloběh uhlíku, vodíku a kyslíku v přírodě.....	12
2.3.1. Uhlík.....	12
2.3.2. Kyslík .....	13
2.3.3. Vodík.....	14
3. Využití stabilních izotopů k určení původu .....	14
3.1. Princip využívání analýzy stabilních izotopů.....	14
3.2. Výběr tkání.....	16
3.2.1. Keratin, keratinizace.....	17
3.2.2. Zápis izotopů do tkání, distribuce po těle.....	18
3.2.3. Vliv stáří jedince na rychlost metabolismu .....	20
3.2.4. Tkáně dělené podle destruktivnosti jejich odběru .....	21
3.2.5. Extrakce lipidů .....	21
3.3. Původ potravin rostlinného a živočišného původu.....	22
3.4. Původ obchodovatelných druhů živočichů a ostatních produktů živočišného původu .....	22
3.4.1. Původ kůží krajty mřížkované a krajty tmavé .....	23
3.4.2. Přepis izotopového signálu se změnou stravy .....	23
3.4.3. Simulace hodnot volné přírody a umělý odchov .....	24
4. CITES .....	25
5. Želvy rodu <i>Testudo</i> .....	26
6. Diskuze .....	28
7. Závěr .....	30
8. ZDROJE.....	31
8.1. Další zdroje .....	34

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Kateřině Jandové, Ph.D. za cenné rady a pomoc při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla za pomoc poděkovat Mgr. Jitce Kufnerové, své konzultantce z ČIŽP. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině za podporu.

# 1. Úvod

Analýza stabilních izotopů je využitelná v několika oblastech vědy – lékařství, geologie, archeologie, ekologie (Brůžek & Kovačiková 2008). Tato bakalářská práce přináší přehled jejího využití v oblasti ekologie a mezinárodního obchodu s chráněnými druhy. Hlavním cílem je zhodnocení, zda lze analýzu stabilních izotopů využít pro ověření původu chráněných obchodovatelných druhů zvířat, se zaměřením na želvy rodu *Testudo*. Poptávka po živočiších z různých oblastí světa roste a je nutné ji regulovat. Kromě legálního obchodu se část prodeje děje na černém trhu, přičemž podíl nelegálního obchodu je vzhledem k jeho povaze nesnadné přesně stanovit trhu (Kučera & Boučková 2010). Metoda analýzy stabilních izotopů by mohla být vhodným nástrojem pro prokázání opravdového místa původu obchodovatelných druhů mimo jiné hlavně proto, že nemusí dojít k destrukci testovaného organismu (například van Schingen et al. 2016).

## 1.1. Cíle práce

Tato práce je rešerší vědeckých článků a studií. Přináší pohled na možnost využívání analýzy stabilních izotopů pro určení geografického původu rostlin a živočichů, které jsou předmětem legálního a nelegálního mezinárodního obchodu. Během růstu organismu se do tkání zabudovávají stabilní izotopy, které jsou získané ze stravy, vzduchu a vody. Poměry stabilních izotopů v tkáních poté korelují s poměry stabilních izotopů vyskytujících se v životním prostředí organismů, které je v době růstu tkání ze svého prostředí čerpají ve formě stravy, pitné vody a vzduchu (Chamberlain et al. 1997).

Mít možnost ověřit místo původu ohrožených obchodovatelných živočichů, rostlin a výrobků z nich je důležitý nástroj v boji proti nelegálnímu obchodu. Abychom uměli metodu analýzy stabilních izotopů pořádně využít, je nutné rozumět izotopovým poměrům v přírodě. Práce přináší i přehled získaný z několika vědeckých studií o tom, jak se izotopové poměry z životního prostředí projevují v izotopových poměrech organismu.

## 2. Stabilní izotopy

Atomy prvků se skládají z elektronového obalu a jádra. Jak již z názvu vyplývá, elektronový obal nese elektrony, jejichž počet je v neutrálním stavu atomu shodný s počtem protonů v jádře. V jádře se též nachází neutrony. Množství neutronů je různé, buď stejné jako množství protonů, nebo vyšší. Izotopy jsou takové atomy prvků, které mají shodný počet protonů a různý počet neutronů. Označují se  ${}^A_ZX$ , kde X je chemická značka prvku, Z je počet protonů a A je počet protonů a neutronů v jádře izotopu. Izotopy známe stabilní (v přírodě 273) a radioaktivní (v přírodě 56). Radioaktivní izotopy podléhají radioaktivnímu rozpadu, tedy po určitém čase (tzv. poločasu rozpadu) dojde k jejich změně, které se využívá například v datování v geologii. Stabilní izotopy zůstávají stejné, v čase se nemění ani jednotlivé izotopy, ani jejich celkový počet na Zemi (tabulka 1). Ke změně však dochází v poměru stabilních izotopů v různých zdrojích. Izotopy jednoho prvku jsou v přírodě zastoupeny různě, zpravidla je nejvíc izotopů nejlehčích (Rundel et al. 1989).

Tabulka 1: Izotopové poměry a jejich standardy (Standardy z Michner, Lajtha 2007).

Prvek	Izotop	Množství (%)	Standard	Izotopový poměr ve standardu
Vodík	${}^1\text{H}$	99,985	SMOW*	${}^2\text{H} : {}^1\text{H}$
	${}^2\text{H}$	0,016		0,000156
Uhlík	${}^{12}\text{C}$	98,892	PDB**	${}^{12}\text{C} : {}^{13}\text{C}$
	${}^{13}\text{C}$	1,108		0,011237
Kyslík	${}^{16}\text{O}$	99,759	SMOW* PDB**	${}^{18}\text{O} : {}^{16}\text{O}$
	${}^{17}\text{O}$	0,037		SMOW = 0,002005
	${}^{18}\text{O}$	0,204		PDB = 0,002067

\* SMOW je Standard podle střední oceánské vody. Běžně se ale využívá VSMOW.

\*\* PDB je Standard podle Pee Dee Belemnite. Belemnite of the Pee Dee Formation je geologický útvar v jižní Karolíně. Belemniti byli vodní hlavonožci žijící od devonu po svrchní křídlo.

Jelikož standardy v přírodě docházejí, byly Atomovou agenturou vytvořeny standardy nové, shodné s původními. Označení umělých standardů má před zkratkou písmeno V (podle místa vzniku, Vídeň – Vienna).



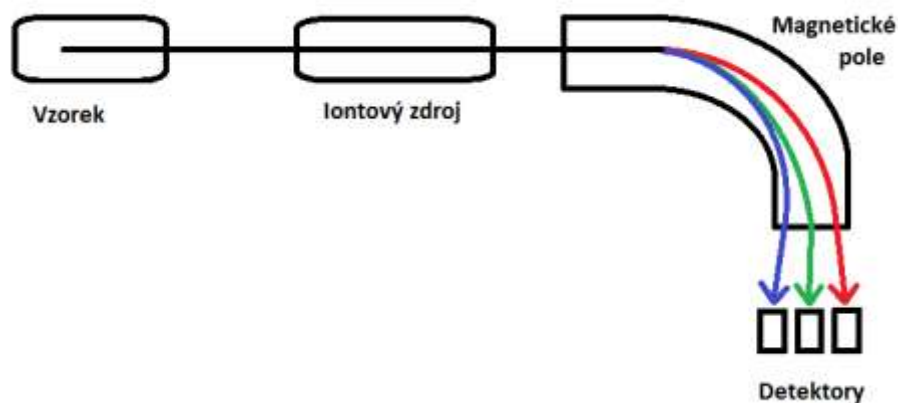
## 2.1. Hmotnostní spektrometrie

Vzhledem k výše napsaným poměrům je zřejmé, že ke zjištění množství stabilních izotopů ve vzorku je zapotřebí citlivých analytických metod, neboť se hmotnosti izotopů často liší jen o jeden neutron. Například molekula oxidu uhličitého  $^{12}_6\text{CO}_2$  je o přibližně 2,3 % lehčí než molekula  $^{13}_6\text{CO}_2$  (Fry 2006, Šantrůček a kol. 2014).

Odebraný vzorek je nutné vyčistit a chemickými úpravami převést na vzorek vhodný pro hmotnostní spektrometrii (IRMS – Isotope Ratio Mass Spectrometry). Tyto úpravy se liší podle tkáně a izotopu, který nás zajímá.

Hmotnostní spektrometr je přístroj, jehož hlavními částmi jsou iontový zdroj, analyzátor s iontooptickým systémem a detektor. Další části jsou vakuový systém, elektronický řídicí systém ovládaný počítačem a zařízení, které slouží pro přípravu a dávkování vzorků. Vzorky pro analýzu musí být v plynném skupenství. Pevné a kapalné vzorky se v plynné převádí v periférii hmotnostního spektrometru. Vzorky obsahující vodík, uhlík nebo dusík jsou spalovány v proudu kyslíku za vzniku oxidů, které jsou dále upravovány do formy, která je potřebná. Vzorky, u kterých se stanovují izotopy kyslíku, není možné spalovat kyslíkem, neboť by došlo k překrytí izotopového signálu. Takové vzorky je tedy třeba rozložit vysokoteplotní konverzí ( $t = 1\,400\text{ °C}$ ). Další možností je chemický rozklad, který se využívá u nespalitelných vzorků, tedy tam, kde je obsažen uhlík v nejvyšším oxidačním stupni. Při analýze se také měří referenční vzorek, kterým je plyn shodný s analytem, ale je u něj známo izotopové složení. Nazývá se též pracovní standard. Systémem protéká chemicky inertní helium, které je nosným plynem (Šantrůček a kol. 2014).

Vstupující molekuly analytu jsou bombardovány emitovanými elektrony, které vyráží z vnějších orbitalů molekul další elektrony. Takto vznikají kladně nabitě ionty, které jsou dále urychleny vysokým napětím a soustředěny do úzkého svazku. V magnetickém poli tvořeném elektromagnetem dochází k zakřivení drah iontů podle poměru hmotnosti iontu a jeho náboje. Takto se od sebe oddělí ionty různé hmotnosti, které se dále zaznamenávají detektorem (Šantrůček a kol. 2014). Schéma hmotnostního spektrometru zobrazuje obrázek 1.



Obrázek 1: Hmotnostní spektrometr, zjednodušeno (<http://www1.lfl.cuni.cz>).

Výsledkem takového měření je poměr počtu ( $R$  – ratio) těžších ( $H$  – high mass) izotopů k lehčím ( $L$  – low mass) ve vzorku.

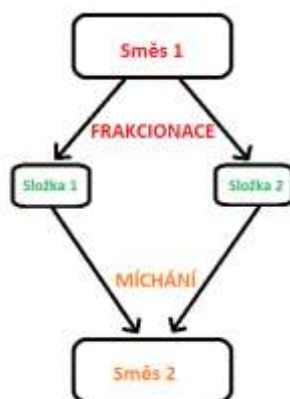
$$R = \frac{H}{L}$$

Tento poměr se dále využívá ke stanovení  $\delta$  (delta) těžšího izotopu. Tato hodnota vyjadřuje odlišnost izotopového zastoupení ve vzorku od poměru v mezinárodním standardu. Rozdíl se udává v ‰.

$$\delta X = \left( \frac{R_{\text{vzorek}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \cdot 1000$$

Čím víc se  $\delta$  blíží nule, tím menší je rozdíl mezi vzorkem a standardem. Pokud je hodnota  $\delta$  menší než 0, pak je vzorek ochuzen o těžší stabilní izotop, je-li hodnota  $\delta$  větší než 0, je vzorek o těžší stabilní izotop obohacen (Fry 2006).

## 2.2. Frakcionace, míchání

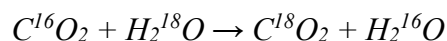


Obrázek 2: Znáznornění průběhu frakcionace a míchání (Fry 2006).

Neutrony mají nezanedbatelnou hmotnost, proto mají vliv na chování atomů. Kvantitativně jsou reakce pro izotopy jednoho prvku stejné, neboť zda budou reagovat, je ovlivněno elektronovým obalem. Kvalitativně se reakce izotopů jednoho prvku nebo stejných molekul s různými izotopy (dále reaktanty) liší. Kinetická energie reakce  $K_E$  je shodná jak pro těžší reaktanty, tak pro reaktanty lehčí. Má tvar:

$$K_E = \frac{1}{2}mv^2$$

z tohoto vztahu vyplývá, že zvýší-li se hmotnost  $m$  reaktantu, musí se snížit rychlost  $v$  reakce. Takto jsou zpomalené i vibrace molekul a díky tomu tvoří těžší molekuly pevnější vazby, které potom dále reagují pomaleji. Příkladem může být následující reakce, která zobrazuje výměnu těžšího izotopu kyslíku z vodní hladiny s lehčím izotopem kyslíku z plynného oxidu uhličitého ze vzduchu. Kyslík s uhlíkem tvoří pevnější vazbu než s vodíkem (Michener & Lajtha 2007).



K frakcionaci dochází při vzniku a zániku vazeb mezi atomy, to znamená, že i při zabudování atomů kyslíku, vodíku a uhlíku do tkání v organismu. Dále také při respiraci a vylučování. Díky tomu dochází k rozdílným izotopovým signálům mezi stravou a tkáněmi konzumenta. To je známo pod pojmem trofická frakcionace (trophic fractionation). Pokud se konzument stravuje z několika zdrojů, pak dochází v jeho těle k mísení izotopových signálů jeho stravy (obrázek 2). Výsledný izotopový signál zobrazuje kombinaci všech těchto zdrojů (Fry 2006).

## 2.3. Koloběh uhlíku, vodíku a kyslíku v přírodě

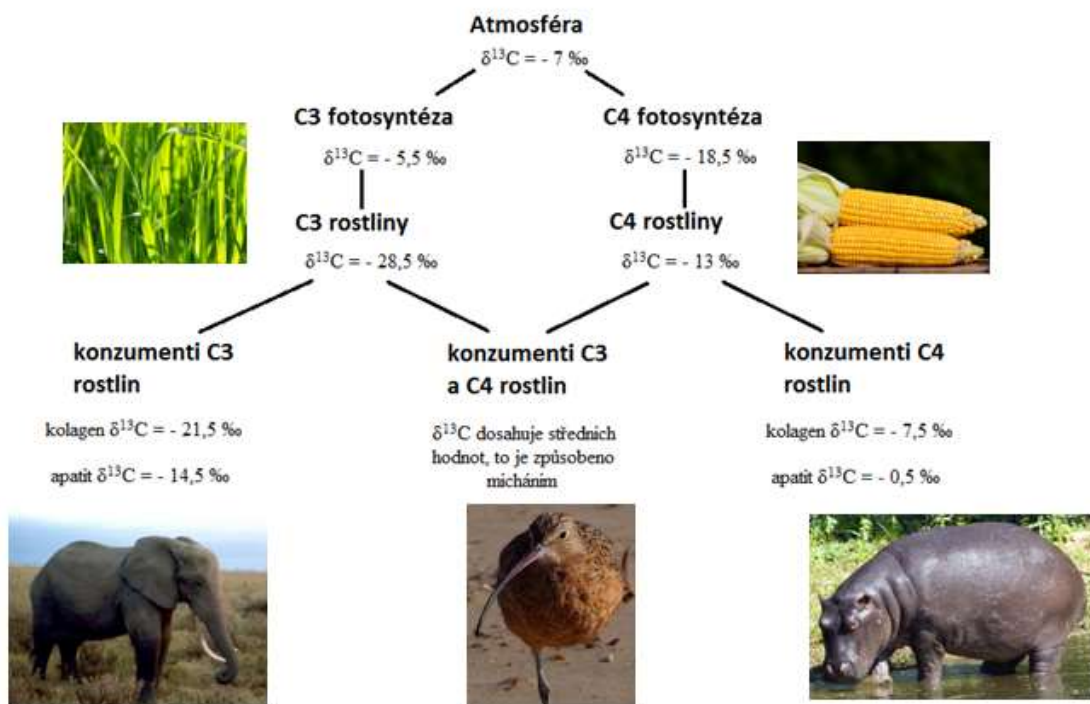
### 2.3.1. Uhlík

Uhlík se vyskytuje v přírodě jako organický i anorganický všude kolem nás. Nejvíce je ho pak v minerálech, zejména v uhličitanech, jako jsou například schránky mořských živočichů. Velké množství uhlíku je i v atmosféře jako sloučenina CO<sub>2</sub>. Stabilní izotopy jsou <sup>12</sup>C a <sup>13</sup>C (Fry 2006).

Spalováním fosilních paliv se hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  v atmosféře snižuje (za 100 let o 1 ‰, tedy v současnosti je -8 ‰) (Fry 2006). Tuto změnu složení ovzduší je možné ověřit analýzou letokruhů stromů. Izotopový signál letokruhu zůstává neměnný, proto jejich porovnáním můžeme zjistit, jak se mění složení ovzduší za určitou dobu (Fry & Peterson 1987). Hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  v atmosféře se dále zvyšuje s teplotou a snižuje s vlhkostí a srážkami (van Klinken et al. 1994).

Uhlík je absorbován rostlinami při fotosyntéze, nejvíce C<sub>3</sub> rostlinami, které mají diskriminaci kolem 20 ‰, izotopový signál C<sub>3</sub> rostlin má hodnotu  $\delta^{13}\text{C} = -28$  ‰. C<sub>4</sub> rostliny mají mnohem nižší diskriminaci, a to kolem 5 ‰, izotopový signál C<sub>4</sub> rostlin má hodnotu  $\delta^{13}\text{C} = -13$  ‰. Střední hodnotu mají CAM rostliny s výsledným izotopovým signálem kolem  $\delta^{13}\text{C} = -21$  ‰ (Fry 2006). Rozdílná frakcionace je způsobena rozdílnými primárními karboxylačními enzymy. Karboxylační enzym C<sub>3</sub> rostlin diskriminuje <sup>13</sup>C mnohem více, než karboxylační enzym C<sub>4</sub> rostlin. Fotosyntéza CAM rostlin je kombinací fotosyntézy rostlin C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> (O'Leary 1981). Mezi C<sub>3</sub> rostliny patří většina stromů, keřů, některé obiloviny, traviny, většina rostlin mírného klimatického pásu. C<sub>4</sub> rostliny jsou například kukuřice, proso, čirok, cukrová třtina, ananas. Jedná se o rostliny rostoucí v prostředí s dlouhodobějším suchem. C<sub>4</sub> rostliny využijí přijatý uhlík ve fotosyntéze vícenásobně (adaptace na sušší prostředí). Rostliny CAM jsou uzpůsobené na hodně suchá prostředí. Mají dužinaté listy, patří sem například tlustice (Brůžek & Kovačiková 2008).

Přirůstající části těla živočichů, jako jsou chlupy a drápy, zrcadlí izotopové složení stravy (Šantrůček 2010). Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  v tkáních jsou závislé na trofické úrovni a na ekologických faktorech (van Klinken et al. 1994). Porovnáním hodnot  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{18}\text{O}$  je možné rozeznat zvíře krmené C<sub>3</sub> rostlinami od zvířete krmeného C<sub>4</sub> rostlinami (Certling et al. 2007, Hobson & Clark 1992). Hodnoty izotopového signálu uhlíku v potravním řetězci ukazuje obrázek 3.

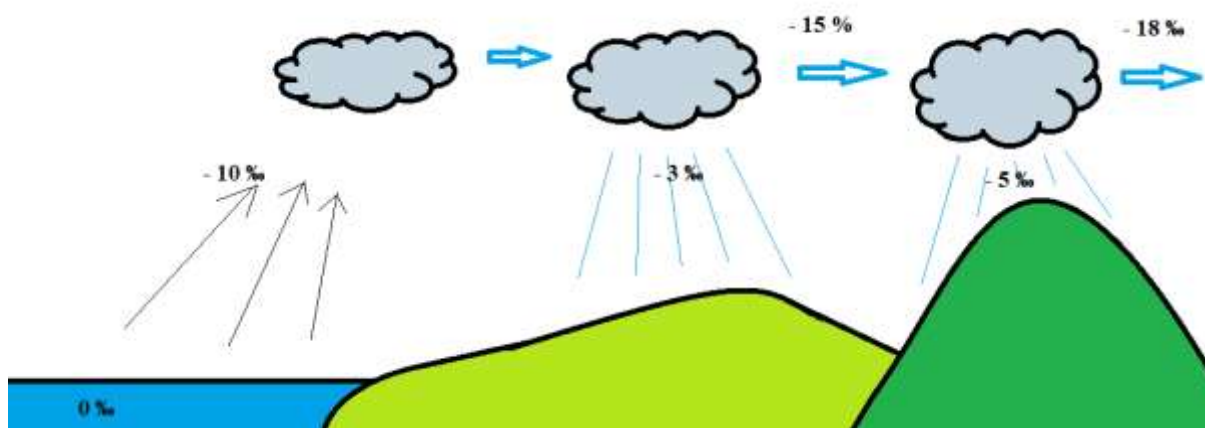


Obrázek 3: Hodnoty izotopového signálu uhlíku v potravním řetězci (Brůžek & Kovačiková 2008, pixnio.com).

### 2.3.2. Kyslík

Hlavní zásobárnou kyslíku na Zemi je voda a atmosféra. Stabilní izotopy jsou  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  a  $^{18}\text{O}$ . Pro sledování pohybu živočichů se používá poměr nejlehčího a nejtěžšího izotopu, tedy  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  (Fry 2006). Izotopový signál je závislý na fotosyntéze, neboť C4 rostliny mají v celulóze vyšší obsah  $^{18}\text{O}$  než rostliny C3. Izotopy kyslíku přijímané organismem ze vzduchu, vody a potravy jsou do kostí a zubů zabudované jako uhličitany a fosforečnany ( $\text{CO}_3^{2-}$  a  $\text{PO}_4^{3-}$ ) v době, kdy dochází k vzniku těchto tkání (Sternberg et al. 1984).

Množství  $^{18}\text{O}$  ve srážkách klesá s nadmořskou výškou, teplotou a vzdáleností od moře. Při rozdílu teploty o  $2,6 \text{ °C}$  dochází k rozdílu  $\delta^{18}\text{O}$  o  $1 \text{ ‰}$  (Yurtsever & Gat 1981). Na planetě Zemi je nejvíce vody v oceánech. Podle oceánu je také určen standardní izotopový poměr pro vodu SMOW (Standard Mean Ocean Water). Nejrychleji se vypařuje lehká voda, proto má voda vypařená z oceánu hodnotu  $\delta^2\text{H} = -10$  až  $-20 \text{ ‰}$ . Těžká voda se rychleji sráží, a tak vznikají tzv. vodní pásma. Čím dál nad pevninu dojdou vodní srážky, tím ochuzenější o těžkou vodu jsou (obrázek 4) (Fry 2006). Těžká voda v řece, která pochází ze zimních srážek, je lehčí než voda pocházející z letních srážek. Je to z toho důvodu, že v létě dochází k výparu a tím zbylá voda těžkne (Streletskiy et al. 2015).



Obrázek 4: Koloběh vody (Fry 2006).

### 2.3.3. Vodík

Vodík má dva stabilní izotopy,  $^1\text{H}$  a  $^2\text{H}$ . Pouze izotopy vodíku mají svůj název  $^2\text{H}$  je deuterium a  $^3\text{H}$  je tritium. Tritium však podléhá radioaktivnímu rozpadu. Nejvíce vodíku je v oceánu, který též určuje standard. Množství  $^2\text{H}$  ve vzdušné vlhkosti klesá jako u kyslíku, tedy s nadmořskou výškou, vzdáleností od moře a teplotou (viz vodní cyklus u kyslíku). Většina vodíku se do těla dostává z potravy, dále též z pití a vzdušné vlhkosti. Při fotosyntéze dochází k výrazné diskriminaci těžkého vodíku proti okolnímu vzduchu. Avšak při tvorbě celulózy a kmenových buněk a při transpiraci dochází k obohacení vytvářených částí rostlin. Takto se původní diskriminace vyrovná a tělo rostliny má podobný izotopový signál jako okolní vzduch (Fry 2006).

## 3. Využití stabilních izotopů k určení původu

Jedno z možných využití stabilních izotopů je určení místa původu rostlin i živočichů a potravin a dalších produktů z nich (Camin et al. 2007, Cerling et al. 2007). Metoda analýzy stabilních izotopů se využívá pro sledování migrace (Schmaltz et al. 2017).

### 3.1. Princip využívání analýzy stabilních izotopů

Pro vystopování geografického původu podle stabilních izotopů se využívají nejběžnější stabilní izotopy, které se vyskytují v organismech. Díky nim můžeme zjistit u živočichů pohyb během roku na delší vzdálenosti (například migrace) a změny stravy. K využití se nám nabízí izotopy lehkých atomů, jako je uhlík (C, izotopy  $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$ ), dusík (N, izotopy  $^{14}\text{N}$  a  $^{15}\text{N}$ ), síra (S, izotopy  $^{32}\text{S}$  a  $^{34}\text{S}$ ), vodík (H, izotopy  $^1\text{H}$  a  $^2\text{H}$ ) a kyslík (O, izotopy  $^{16}\text{O}$  a  $^{18}\text{O}$ ) nebo těžké kovy, jako

například stroncium (Sr, izotopy  $^{86}\text{Sr}$  a  $^{87}\text{Sr}$ ) a olovo (Pb, izotopy  $^{206}\text{Pb}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  a  $^{208}\text{Pb}$ ). Vliv na hodnoty  $\delta$  stabilních izotopů mají biologické i biochemické procesy. Poměr stabilních izotopů uhlíku konzumenta je shodný nebo mírně zvýšený (přibližně o 0 - 1 ‰) proti poměru stabilních izotopů uhlíku potravy. Pokud bychom chtěli sledovat trofickou úroveň jedince, je vhodné použít stabilní izotopy dusíku, neboť jeho hodnoty  $\delta$  se s každou trofickou úrovní zvyšují o 3 - 5 ‰, což je ovlivněno například přednostním vylučováním lehčího dusíku. Síra je vhodná pro rozlišení mořské a suchozemské stravy, neboť její izotopy se v těle konzumenta propisují přesně ve shodě s potravou. Stabilní izotopy vodíku a kyslíku se odrážejí od vody dostupné v potravě a pitné vodě. Kyslík je navíc přijímán z atmosféry (u suchozemských organismů). Stroncium můžeme najít v kostní tkáni, neboť je podobné vápníku, a proto jej ve vazbách nahrazuje (Chamberlain et al. 1997, Dustin & Hobson 2004).

V současnosti se pro určování geografického původu a sledování migrace zvířat využívá několik metod. Patří sem radiosignál (tedy signál čipu, který je vpraven do těla jedince, nebo přidělán na něj), uměle přidané značky (například kroužky u ptáků na nohou), individuální přirozené znaky (například DNA, charakteristické značky na kůži, srsti). Všechny tyto metody vyžadují odchytávání jedince nejprve pro zavedení, respektive zaznamenání individuální značky a později pro kontroly a úpravy. Komplikací je, že charakteristické přírodní znaky mohou být v populaci velmi podobné, zajímá-li nás konkrétní jedinec, nejedná se o nejvhodnější metodu. Sledování pohybu pomocí stabilních izotopů je výhodné, neboť stačí pouze jedno odchycení jedince, případně je možné využít jedince uhynulého (Chamberlain et al. 1997, Dustin & Hobson 2004).

Hobson & Clark (1992) dělali analýzu stabilních izotopů na několika ptácích (křepelky, kuřata, racci, sokol), aby porovnali rozdíly mezi nimi. Bylo zjištěno, že poměry stabilních izotopů nezávisí na věku dospělého, ale na potravě. Kostní kolagen všech druhů byl proti jiným tkáním obohacenější o  $^{13}\text{C}$ . Z ptactva se analyzují pera, která korelují s izotopovými poměry místa, kde vyrostla. Význam to má hlavně pro migrující druhy, u kterých můžeme pomocí stabilních izotopů určit jejich letní a zimní stanoviště. Schmaltz et al. (2017) odebrali vzorky zimního a letního peří jespáka bojovného. V létě tento pták tráví čas v Nizozemí a v zimě pak v Africe, nebo ve Středozeří. V Nizozemí tvoří stravu  $\text{C}_3$  rostliny, v subsaharské Africe to jsou  $\text{C}_4$  rostliny a na stanovištích v Evropě se objevují jespáci v zemědělských oblastech, strava se tedy odvíjí od pěstovaných plodin. Díky rozdílné stravě lze rozeznat, zda jedinec zimoval v Africe, nebo na jihu Evropy. Na začátku dubna, tedy brzy po přiletu zpět do Nizozemí byla u odchycených jedinců odebrána krev, ze které byly testované krvinky a plasma. Díky těmto testům bylo zjištěno, který

jedinec zimoval v Africe a který v Evropě. Rozdílem mezi zimním a letním peřím se zabývají také Chamberlain et al. (1997). Zde ale navíc využili stabilních izotopů stroncia ( $^{86}\text{Sr}$  a  $^{87}\text{Sr}$ ) v kostech. Testovaným objektem byl lesňáček modrohřbetý, hmyzožravý pták, který je třetí trofickou úrovní. Díky tomu jsou jeho tkáně proti okolnímu vzduchu obohacenější o uhlík a dusík. Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  peří jsou přibližně o 3-4 ‰ vyšší než pro stravu.

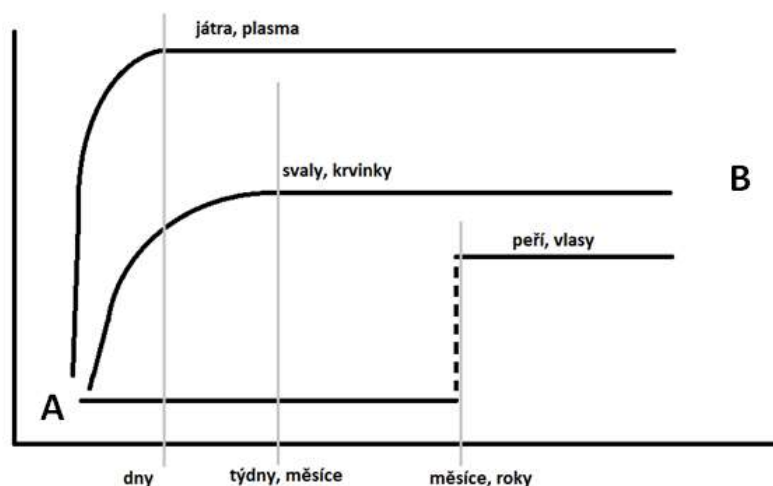
### 3.2. Výběr tkání

Abychom zjistili informace, které chceme znát, je důležité si správně vybrat tkáň a stabilní izotopy, jejichž poměr budeme zjišťovat. Tkáně vybíráme podle toho, jak dlouhý časový úsek požadujeme zobrazit a zda můžeme organismus usmrtit. Stabilní izotopy pak volíme ty, které jsou pro danou věc charakteristické, ne obecné. Důležité je samozřejmě chápání izotopových poměrů v přírodě (Dustin & Hobson 2004). Možné a již testované tkáně u plazů jsou krev (často členěná na červené krvinky a krevní plasmu), játra, svaly, kost, šupiny, nebo u želv keratinové štítky krunýře (Marques et al. 2011, Ogden et al. 2004, Drtinová 2011).

Testované tkáně můžeme rozdělit podle rychlosti metabolického obratu. Metabolicky aktivní tkáně zobrazují kratší časový úsek. Strava se do těchto tkání otiskne a při každé změně (od několika dní déle) dojde i ke změně izotopového signálu tkáně (Dustin & Hobson 2004). Krev, játra a svaly mění izotopový signál rychle. Konkrétně pak u plazmy a jater jsou to hodiny až dny. Svaly a krev jako celek zobrazí až několik týdnů (Dustin & Hobson 2004). Toho využili Schmaltz et al. (2017), když provedli odchyt deseti jedinců jespáka vracejícího se ze zimoviště. Izotopový signál krve osmi jedinců se již shodoval s místem odchytu, zatímco izotopový signál zbylých dvou koreloval se zimovištěm. Krev se po odběru uchovává s konzervanty. Vlivem těchto konzervantů se zabývali Lemons et al. (2012). Krev byla odebrána od karet obrovských a testovány byly tři nejběžněji používané konzervanty: ACD (roztok kyseliny citronové a dextrosy), SH (heparin sodný) a EDTA (ethyldiamintetraoctová kyselina). ACD hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  zvýšil, EDTA ovlivňuje hodnoty  $\delta^{15}\text{N}$ . Jen SH neměla vliv na izotopové poměry v odebrané krvi. Pomalejší metabolický obrat má kostní kolagen, jehož analýzou můžeme zobrazit i roky (Dustin & Hobson 2004).

Poslední skupinou jsou metabolicky inertní tkáně. Řadíme sem ty tkáně, u kterých nedochází ke změně narostlé části a další přírůstky se jen přidávají k původním. Sem patří například keratin, který můžeme nalézt v peří, drápech, či štítkách krunýře želv (Dustin & Hobson 2004). Rychlosti změny izotopového signálu tkání zobrazuje následující graf (obrázek 5).





Obrázek 5: Zobrazení rychlosti změny poměru stabilních izotopů v tkáních při přechodu z oblasti A do oblasti B (Hobson 1999).

### 3.2.1. Keratin, keratinizace

Zrohovatělá vrstva, která je synonymem pro keratin, se skládá z proteinů. Proces keratinizace je vlastně programovaná buněčná smrt, nejde tedy o klasické odumírání buněk. Keratinizace trvá asi dva týdny, kdy dojde ke vzniku keratinových vláken, ze kterých se na povrchu epidermis vytváří síť (Lippens et al. 2005). Během keratinizace se keratinocyty posunou ze spodní epidermální vrstvy, kde dochází ke zplošťování buněk a začíná keratinizace, přes granulární strukturu, kde se objevují jako keratohyaliny, až do vrstvy horní. Během přesunu dochází k buněčné diferenciaci a buňky formují keratin, odumírají a stávají se metabolicky neaktivními. Ve střední vrstvě je mezibuněčný prostor vyplněn lipidy, které pochází z mezibuněčných lamel mezi keratinocyty v této vrstvě. Keratinocyty prochází všemi vrstvami, postupně mizí organely a plazmatická membrána začíná keratinizovat, až je zcela nahrazena keratinovým obalem (Matoltsy 1976, Lippens et al. 2005).

Keratinové monomery jsou tvořeny ze 400 - 650 jednotek aminokyselin a jsou shlukovány do svazků, ze kterých jsou formována vlákna (tzv. intermediální filamenta). Keratinů je známo mnoho druhů, některé se vyskytují v epidermis kůže, jiné ve vlasech, peří, kožních derivátech, nebo střevní výstelce. Jsou nerozpustné ve vodě, mají vláknitou strukturu (Lippens et al. 2005). Do aminokyselin a tedy do keratinu je vodík, kyslík a uhlík zabudován hned na začátku při tvorbě, avšak část vodíku (40 %) zůstává vyměnitelná s okolím (Hobson & Koehler 2014).

Keratin může být uspořádán do dvou různých struktur, které vytváří tzv.  $\alpha$ -keratin a  $\beta$ -keratin.  $\alpha$ -šroubovice je tvořená vláknitým proteinem,  $\beta$ -struktura má podobu skládaného listu

(Wyld & Brush 1979). Polypeptidický řetězec  $\alpha$ -šroubovice je stabilizován několika stabilními můstky, hlavně disulfidovými a vodíkovými (Matoltsy 1976).  $\beta$ -keratin se okamžitě polymeruje do cytoplazmatických svazků (Valle et al. 2009). U plazů lze nalézt oba druhy keratinu.  $\alpha$ -keratin je spíše v měkkých pohyblivých tkáních, je elastický (krk u želv).  $\beta$ -keratin je naopak pevný, mnohem méně elastický, vyskytuje se tedy spíše v pevných místech, kde slouží jako ochrana (u želv krunýř). V krunýři želv můžeme nalézt i  $\alpha$ -keratin, ale silně převažuje  $\beta$ -keratin (Alibardi & Toni 2006).  $\beta$ -keratiny želv se podobají  $\beta$ -keratinu v drápech krokodýlů i ptáků. Lze předpokládat, že se keratin skládá z největší části z uhlíku (52 %), ze 30 % z kyslíku, 11 % dusíku a 7 % vodíku, neboť velká část by měla být tvořena ze sekvencí aminokyselin prolin-glycin-tyrosin (Valle et al. 2009).

Na krunýři želv přirůstají keratinové štítky pod sebe. Nejnovější část je vždy o něco větší než části starší. Přirůstání zobrazuje obrázek 6.



Obrázek 6: Znázornění přirůstání keratinových štítků na krunýři želv (Alibardi 2005).

### 3.2.2. Zápis izotopů do tkání, distribuce po těle

Zabudování kyslíku a vodíku do keratinu je nejčastěji zkoumáno na ptácích. Zdrojem těchto prvků a jejich izotopů je strava a vzduch, kyslík se navíc dostává do peří i z pití. Hobson a Koehler (2014) zjistili, že hodnoty  $\delta^2\text{H}$  v peří a ve srážkách v oblasti, kde testovaní jedinci rostli, spolu korelují více než hodnoty  $\delta^{18}\text{O}$ . Děje se tak právě proto, že kyslík je míchán z více zdrojů.

V roce 1997 se zabývali Chamberlain et al. otázkou vyměnitelného vodíku mezi keratinem a vzduchem. Testovaným organismem byl lesňáček modrohřbetý. Vzorky peří byly odebrány z 9 lokalit od přibližně 20 jedinců z každé lokality. Část peří byla uložena ve vodě o známém izotopovém složení a část ve vodní páře o známém izotopovém složení. Měřením bylo zjištěno, že nejvíce vodíku je vyměněno během prvních 16 dní, přičemž nezáleží na skupenství vody, s kterou dochází k výměně. Celkem bylo vyměněno asi 13 % vodíku (z odhadovaných 40 %). Vliv na izotopový signál peří nebude tak výrazný, jak se očekávalo. Druhou otázkou bylo, zda záleží

na tom, z jaké části těla jedince bylo peří odebrané. Byly testovány vzorky peří z hrudi a ocasu. Nebyla pozorovaná odchylka, která by značila, že distribuce do peří je různá podle části těla (Chamberlain et al. 1997).

Další studie zabývající se distribucí stabilních izotopů v těle byla provedena též na ptácích, bahňácích. Byly porovnávány následující tkáně: krev jako celek, krevní plazma, červené krvinky, játra, ledviny, prsní svalstvo a pera. Byli odchyceni pouze samci, aby se předešlo ovlivnění výsledků kvůli případným rozdílům pohlaví. Odchycení jedinci byli chováni v klecích s doplňujícím umělým světlem, které mělo za úkol také zvyšovat teplotu vzduchu. Testování totiž probíhalo ve vyšších polohách, než kde došlo k odchytu, tedy v oblasti, kde je chladněji proti místu přirozeného výskytu bahňáků. Každý týden byli testovaní jedinci zváženi a byla jim odebrána krev. Po 54 dnech došlo ke změně stravy a po 113 dnech testování došlo k vypuštění ptactva v místě odchytu. Každý týden byly odebrány i vzorky stravy. Ze svalů byly extrahovány lipidy. I zde bylo potvrzeno, že distribuce stabilních izotopů mezi tkáněmi je různá. V keratinu peří byla propsána nedávná strava. Dalším podnětem pro výzkum by mohlo být, jak ovlivní prostor k pohybu metabolismus tkání (Ogden et al. 2004).

V roce 2013 vybral Wolf et al. pro svůj výzkum japonské křepelky. Jejich denní příjem vody je vyšší než u jiných ptáků. Křepelky byly rozděleny do tří skupin, z nichž každá dostávala po dobu trvání experimentu izotopově upravenou vodu. Na konci byly usmrceny a následující tkáně byly podrobeny analýze. Jednalo se o krev rozdělenou na plasmu a červené krvinky, játra, svaly, peří, tělesná voda a střevo. Odběr krve probíhal po celou dobu experimentu. Ze vzorků byly extrahovány lipidy. Porovnáním izotopových signálů testovaných tkání bylo zjištěno, že peří a tělesná voda jsou obohacené o  $^2\text{H}$ , zatímco obohacení o  $^{18}\text{O}$  se projeví v játrech. Wolf et al. se domnívají, že rozdílnou distribuci stabilních izotopů v tkáních má na svědomí různé složení aminokyselin. Co ale nemá vliv na distribuci, je pohlaví. I o tom se přesvědčili autoři této studie.

Struck et al. 2002 analyzovali drápy, obsah střev a měkké tkáně varanů. V prostředí sucha jsou tkáně obohacené o  $^{15}\text{N}$ . Pokud jsou roční srážky více než 800 mm, může se frakcionace zvýšit až o 11 %. Marques et al., 2011 porovnávali tkáně 6 vousivek. Tyto želvy žijí ve znečištěných řekách jižní Ameriky, kde byly pro tuto studii odloveny. Jako vzorky byly použity svaly (z oblasti břicha, paží, nohou a krku), krunýř a drápy. Vzorky byly sušeny při 50 °C do konstantní hmotnosti a byly očištěny od nečistot a lipidů. Hodnoty v drápech a svalech byly shodné, mezi svaly a krunýřem byly významné rozdíly.

Jedny z testovaných želv byly želvy Agassizovy, které žijí na jihozápadě USA v aridní oblasti. Cílem studie bylo zjistit, jak se zakomponuje uhlík z potravy do těla a jaké budou rozdíly v tkáních. Bylo testováno 7 želv v období po první hibernaci, tedy přibližně 6 měsíců stará mláďata. Želvy byly chované ve známých podmínkách (teplota, podklad, sluneční svit doplňovaný umělým světlem a potrava). Výkrm probíhal 371 dní, kdy 307 dní byly krmeny stravou A (obsah 9 % proteinu,  $\delta^{13}\text{C} = -25 \text{ ‰}$ ) a poté stravou B (obsah 15 % proteinu,  $\delta^{13}\text{C} = -21,9 \text{ ‰}$ ). Mezi testované tkáně patřily červené krvinky, krevní plazma a keratinové štítky. Váha a rozměr jedinců byly kontrolovány každých 30 dní. Krev byla odebírána v daném rozmezí po celou dobu experimentu (na začátku byly vzorky odebírány častěji než na konci). Časté odběry krve byly pro želvy náročné, neboť nemohlo dojít k úplné regeneraci místa odběru. Ze štítků byla odebrána nepřekrývající se oblast, tedy ta, kde byl pouze poslední přírůstek. V průběhu experimentu došlo u želv k přírůstku 2 - 5 štítků. Vzorky byly po extrakci lipidů přendány do cínových kapslí. Pokud byl některý ze vzorků větší, byl rozdělen na několik dílů a výsledná hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  byla průměrem naměřených hodnot. Bylo potvrzeno, že strava ovlivňuje izotopový signál jedince. Krev se dostala do rovnováhy se stravou, přičemž plazma vykazovala rychlejší vyrovnání než červené krvinky. Štítky krunýře byly proti původním hodnotám výrazně obohaceny. Jak bylo zmíněno výše, jednalo se o velmi mladé jedince želv. Je tedy možné, že začleňování uhlíku, které bylo zjištěno, je v tomto období nejrychlejší za celý jejich život i vzhledem k rychlosti růstu, která byla pozorována. Dále pak podmínky, ve kterých byly želvy chovány, byly ideální a neměnné po celou dobu. Je tedy možné, že stejně staří jedinci v přírodě by vlivem kolísání teploty, srážek, slunečního svitu a tím i změny stravy nedosáhli takového zvětšení jako testovací skupina (Ogden, Hobson & Lank, 2004).

### **3.2.3. Vliv stáří jedince na rychlost metabolismu**

V roce 2007 provedl McCue testování na madagaskarských švábech. Cíle práce byly rozsáhlé. Byly vytvořeny dvě testovací skupiny, každá byla krmena jinou stravou. Skupina A měla granule na bázi C3 rostliny – rýže, skupina B měla granule na bázi C4 rostliny – kukuřice. Došlo k odchování několika generací. Následující generace byly rozděleny na dvě části. Jedna pokračovala ve stejné stravě jako mateční generace a druhá byla krmena stravou opačnou. Dále byl testován vliv stresových situací, konkrétně šlo o snížení teploty a hladovění a vliv extrakce tuků na zjištěné hodnoty. Vzorky potravy byly odebírány každých 60 dní, aby došlo k ověření jejich stálosti.

Bylo zjištěno, že lze přepsat hodnoty získané z původní stravy (případně hodnoty přejaté mládětem od matky) na hodnoty získané z nové stravy. Rychlost, jakou toho lze dosáhnout, byla porovnána pro dospívající a dospělé jedince. Bylo zjištěno, že věk má významný vliv na rychlost

metabolismu. U dospívajícího jedince dojde k rychlejšímu přepisu než u dospělého. Ani jedna stresová situace neměla vliv na rychlost metabolismu. Extrakce lipidů má významný vliv na poměr stabilních izotopů, neboť vzorky s lipidy jsou ochuzenější o izotop  $^{13}\text{C}$  než ty, z nichž byly lipidy extrahované (McCue 2007).

Vliv stáří jedince na metabolismus tkání byl pozorován i u lišky obecné (Hobson & Roth 2000).

#### **3.2.4. Tkáně dělené podle destruktivnosti jejich odběru**

Destruktivní odběry vzorků jsou ty, při nichž dojde k usmrcení testovaného jedince. Jsou to svaly a vnitřní orgány. Tyto odběry se využívají nejčastěji pokud jde o testování uhynulých jedinců (například Chamberlain et al. 1997), nebo pokud se jedná o laboratorní experiment (například McCue 2007, Wolf et al. 2013).

Nedestruktivní jsou pak odběry těch tkání, které lze odebrat bez nutnosti usmrcení testovaného jedince. Patří sem krev, jejíž odběry ale nemusí být vždy pro zvíře bezproblémové. Například pokud je krev během experimentu želvám odebírána častěji (rozmezí dní), je to pro ně náročné kvůli regeneraci jizev. Vysoké nároky jsou v těchto případech kladeny i na schopnost člověka, neboť je nutné želvě natáhnout krk, aby se zpřístupnily hlavní žíly (Ogden et al. 2004).

Pokud je to možné, je vhodnější odebrat kousek drápu nebo keratinu z krunýře, případně peří, protože při takovém vzorkování nedojde k poškození jedince (například van Schingen et al. 2016).

#### **3.2.5. Extrakce lipidů**

Extrakce lipidů z odebraných vzorků je důležitá, neboť jejich frakcionace  $^{13}\text{C}$  je až o 8 ‰ nižší než ostatních tkání. Při analýze tkáně obsahující i lipidy by byl ovlivněn izotopový signál a z toho důvodu by mohlo dojít ke špatnému odhadu geografického původu (Fry & Peterson 1987, McCue 2007). Extrakce lipidů z keratinových štítků se provádí roztokem chloroformu a methanolu (Ogden et al. 2004).

### 3.3. Původ potravin rostlinného a živočišného původu

Camin et al. (2007) se zaměřili na jateční maso. Bylo odebráno 13 vzorků ze zamýšlených 15-20 regionů v Evropě. Kromě původu vzorků byl znám též chov a strava testovaných jedinců. Vzorky, na kterých se zjišťovaly stabilní izotopy prvků H, C, N, S, byly vysušeny mrazem a extrahovány od lipidů. Prvky a jejich izotopy se do těla dostávají z různých zdrojů, které jsou charakteristické pro dané území, jsou ovlivněny geografickými, hydrologickými a klimatickými podmínkami. Hodnoty poměru stabilních izotopů vzorků byly porovnány s poměry oblasti, ze které byly odebrány. Výsledky byly dostatečné, aby se dalo určit, odkud který vzorek pochází. Pokud by ale izotopový signál několika vzorků byl velmi podobný a nedal se tak určit původ, bylo by vhodné využít analýzu stabilních izotopů dalších prvků, které by byly charakteristické pro dané území. Mohou to být například těžké kovy, jako je olovo a stroncium.

Kukusamude & Kongsri (2018) zjišťovali původ thajské jasmínové rýže, aby zjistili, zda lze odhalit falešné označování a podvádění s místem původu. Kromě stabilních izotopů ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ) byla využita i analýza dalších prvků. Zároveň byla analyzována oblast, kde rýže vyrostla. Rýže byla přiřazena k místu původu se 100% přesností.

Wadood et al. (2018) zjišťovali izotopový signál v různých frakcích pšenice. Použili  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$ . Mezi frakcemi a celou pšenicí byla zjištěná významná pozitivní korelace. Určení izotopového signálu mouky je tedy možné, aniž by bylo nutné testovat celé zrno pšenice, ze které byla mouka namleta. Zároveň byla celá zrna i jejich frakce použita pro určení původu, kdy bylo správně přiděleno téměř 94 % vzorků.

### 3.4. Původ obchodovatelných druhů živočichů a ostatních produktů živočišného původu

Pokud by byla metoda analýzy stabilních izotopů využitelná pro použití při ověřování geografického původu ohrožených druhů, není vhodné využívat tkáň, pro jejichž odběr je nutné usmrtit živočicha. Pro nedestruktivní metody se tedy využívají keratin (želví krunýř) anebo kolagen (šupiny ryb). Jako dovážené části těl (i ve formě výrobků) se objevují například kly (slonovina), nebo bioapatit (zuby),

Coutu et al. (2016) porovnávali kromě poměrů stabilních izotopů kyslíku a uhlíku ve slonovině i poměr  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ . I přesto, že zde byla uvažována kombinace izotopů několika prvků, výsledkem je, že není možné naprosto přesně určit původ, pokud nemáme porovnávací hodnoty a je tedy snazší říci, odkud jedinec určitě není. Ziegler et al. (2016) měli k dispozici soubor 507

vzorků slonoviny. Vybrali si z nich 144 vzorků, které byly analyzovány později jako vzorky neznámého původu. U ostatních nejprve určili  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\delta^2\text{H}$  a  $\delta^{34}\text{S}$ . Dané hodnoty byly přiřazené k místům původu, a tak sloužily jako „kalibrační standardy“. Vybrané vzorky byly též zanalyzovány. Výsledky byly porovnány se „standardy“ a díky tomu přiřazeny k místu původu. Některé vzorky byly určeny přesně, celkem 50 % vzorků bylo přiřazeno v oblasti maximálně 381 km od pravého místa původu. Nad 3000 km, tedy velmi daleko od reálného místa původu, bylo určeno jen 9 % vzorků. Cerling et al. (2007) měli také sadu vzorků slonoviny se známým původem. K těmto vzorkům dostali další z Keňské celnice, aby bylo ověřeno, zda opravdu pochází z Keni. Zde bylo potvrzeno, že část vzorků pochází z Keni, ale některé byly z jiných oblastí Afriky.

#### **3.4.1. Původ kůží krajty mřížkované a krajty tmavé**

Jedná se o první experiment tohoto typu. Porovnávání byly podrobeny tři populace. Jedna populace byla chovaná v zajetí ve Vietnamu (farma legálně obchodující s hadími kůžemi), druhá populace volně žijící ve Vietnamu a třetí populace byla z volné přírody z Indonésie. Součástí bylo porovnání rozložení stabilních izotopů v kůži po celém těle. Hadi chovaní v zajetí byly rozděleni ještě na další skupiny podle stravy, která nebyla testovaná na stabilní izotopy, neví se tedy, jak moc se od sebe lišila.

Rozložení stabilních izotopů v kůži po celém těle krajty je shodné. Volně žijící krajty z Vietnamu měli  $\delta^2\text{H}$  o 10 ‰ nižší, než jedinci chovaní ve Vietnamu a volně žijící hadi v Indonésii. Mezi výsledky indonéských divokých jedinců nebyla taková variabilita, jako u obou vietnamských skupin.

Závěrem práce bylo, že je možné podle izotopového otisku stravy zjistit původ, pokud máme na výběr určitá místa a k nim máme jedince přiřadit. Odhadnout místo původu jen podle naměřených hodnot již není tak snadné a přesnost není jistá. Aby bylo možné tuto nejistotu odstranit a určit původ přesně jen z naměřených dat, bylo by třeba mít standardy izotopového signálu pro porovnávání (Natusch et al., 2017).

#### **3.4.2. Přepis izotopového signálu se změnou stravy**

Krokodýlovec čínský je ohrožený kvůli ztrátě biotopu a nadměrnému mezinárodnímu obchodu ([www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)). Na třech testovacích skupinách byly zjišťovány v šupinách poměry  $\delta^{13}\text{C}$  a  $\delta^{15}\text{N}$ . První skupina byla tvořena divokými jedinci, ve druhé skupině byli jedinci odchyceni v přírodě a alespoň tři roky chováni v zajetí. Poslední skupina byla tvořena jedinci

chovanými v zajetí od narození. Součástí experimentu bylo zjistit, jaký vliv na hodnoty má znečištění vody. Stabilní izotopy o známých poměrech byly použity na znečištění toku, kolem kterého žilo několik jedinců z divoké testovací skupiny (van Schingen et al. 2016).

Izotopový signál šupin "přechodné skupiny" byl přepsán na hodnoty velmi blízké šupinám skupiny pouze chované v zajetí. Rozdíl mezi chovanými a divokými jedinci byl pro  $\delta^{13}\text{C}$  téměř 1 ‰ a pro  $\delta^{15}\text{N} = 3$  ‰. Výzkumníci se pokusili vzorky zpětně přiřadit ke správným skupinám. Ve většině případů došlo ke správnému zařazení. Nejvíce chyb bylo u vzorků z "přechodné skupiny", mezi vzorky z volné přírody a z chovu nedošlo k žádné záměně. Chovaní živočichové byli obohacenější o těžší izotopy obou prvků (van Schingen et al. 2016). Potravou byli larvy a červi, kteří mají ve volné přírodě nižší hodnoty  $\delta$  než larvy a červi odchované člověkem (Struck et al. 2002).

Rozdíly mezi jedinci ze stejné skupiny byly nejpatrnější u skupiny volně žijících krokodýlovců. Vliv na to měla nadmořská výška, neboť hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  se s každými 1000 m. n. m. v rostlinách o 1 ‰ zvyšuje. Dále se autoři domnívají, že by vliv mohla mít ubývající mezidruhová konkurence. Jedinci se ve vyšších nadmořských výškách živí takovou stravou, která je homogennější a dochází tak k míchání izotopového signálu z méně zdrojů. Znečištění nemělo podle naměřených hodnot významný vliv na poměr stabilních izotopů uhlíku, ani dusíku (van Schingen et al. 2016).

### **3.4.3. Simulace hodnot volné přírody a umělý odchov**

V roce 2011 byl proveden, dle mého zjištění, jedinečný experiment s želvami rodu *Testudo*. Cílem bylo ověřit, jak se projeví rozdílné izotopové složení potravy v přirůstajících štítcích krunýře. Želvy byly rozděleny do dvou skupin, jedna kontrolní a druhá testovací. Pro kontrolní skupinu byla pěstovaná strava zalévána kohoutkovou vodou, kterou skupina též dostávala k pití. Pro skupinu testovací byla pěstovaná tatáž strava, ale zalévána izotopově upravenou vodou. Upravená voda měla hodnoty, které měly odpovídat hodnotám na Kypru, tedy v místě přirozeného výskytu testovaných želv. Tuto vodu jedinci z testovací skupiny též pili. Vzorky byly oběma skupinám odebrány na začátku a na konci experimentu, aby bylo možné hodnoty porovnat a potvrdit změnu izotopového signálu. Průběžně byly odebírané i vzorky stravy. Vzorky byly odeslány do specializované laboratoře, kde došlo k jejich proměření v hmotnostním spektrometru. Výsledné izotopové signály štítků i pěstované stravy se od sebe téměř nelišily, což neodpovídá zjištěným informacím (Drtinová 2011).



Vedle testovací a kontrolní skupiny byli k dispozici uhynulí jedinci s doloženým místem původu. Vzorky keratinového štítu byly odebrány a výsledky hmotnostní spektrometrie porovnány s izotopovým poměrem v místě původu. Hodnoty poměru izotopů štítů uhynulých jedinců odpovídaly místu původu (Drtinová 2011).

#### 4. CITES

V roce 1973 byla ve Washingtonu přijata Úmluva o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Úmluva byla navržena Světovým svazem ochrany přírody (IUCN, International Union for Conservation of Nature), který si již v šedesátých letech uvědomoval, že obchod s ohroženými volně žijícími živočichy a planě rostoucími rostlinami je nutné regulovat. Nadměrné využívání pro komerční účely pomalu vede k vymírání druhů v přírodě. Kromě obchodu s ohroženými druhy z volné přírody je kontrolován i obchod s ohroženými druhy, které pocházejí ze zajetí. Vedle legálního obchodu s živou přírodou tvoří významnou část i obchod nelegální, kterému se snaží signatáři CITES zabránit (Kučera, Boučková, 2010). Podle stupně ohrožení jsou druhy živočichů a rostlin zařazeny do skupiny I, II nebo III. Želvy *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* a *Testudo marginata* jsou součástí přílohy II (Nařízení Komise (EU) č. 709/2010).

Úmluva CITES vstoupila v platnost 1. července 1975, kdy ji závazně potvrdilo a přijalo 10 prvních států. Dnes je pod CITES podepsaných 183 zemí (údaj z [www.mzp.cz](http://www.mzp.cz)), včetně všech členů EU. 28. května 1992 se připojilo i Československo, Česká republika smlouvu uplatňuje bez přestání i po rozdělení. Největším dovozcem živé přírody je Evropská unie (Kučera, Boučková, 2010).

EU má od roku 1984 jednotnou legislativu pro mezinárodní obchod i obchod uvnitř EU (Kučera & Boučková 2010). Jde o nařízení Rady (ES) č. 338/97 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi. Skupiny ohrožených druhů z CITES jsou přerozděleny do 4 skupin. V nařízení Komise (EU) č. 709/2010 nalezneme seznam chráněných druhů rozdělených do skupin A, B, C, D i s informací, ve které skupině CITES se živočich nebo rostlina nachází. Želvy *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* a *Testudo marginata* jsou ve skupině A, která zahrnuje nejohroženější druhy. V České republice stanoví podmínky pro obchod a další opatření sloužící pro zajištění a evidenci ohrožených druhů na našem území zákon

100/2004 Sb., o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi a dalších opatřeních k ochraně těchto druhů (Kučera & Boučková 2010).

Obchod s chráněnými druhy rostlin a zvířat lze jistým způsobem považovat za zdroj těchto organismů. Obchod se živými exempláři druhů podléhajících nejprísnějšímu stupni ochrany podle CITES je zakázán, pokud nelze uplatnit některou z výjimek, například odchov nebo vypěstování v zajetí. Aby byl jedinec považován za odchovaný, respektive vypěstovaný v zajetí, je nutné, aby i jeho rodiče byli chováni, respektive pěstováni v zajetí, aby ke kopulaci docházelo v zajetí. Nejblížejší možná je tedy druhá generace. Toho lze využít u jedinců nově popsáných druhů, u kterých známe délku reprodukce. Mějme například živočicha, který je rozmnožování schopen po dvou letech od vylíhnutí, respektive narození. Jako nelegální obchod lze s jistotou označit každý, který bude uskutečněn dříve než 2 roky po popsání tohoto živočicha (Hinsley & Roberts 2018). Předmětem dovozu nejsou jen živé rostliny (např. kaktusy, orchideje) a zvířata (např. exotičtí ptáci, tropické ozdobné ryby), ale i různé předměty z nich, či jen části organismů (např. kůže plazů, kožešiny, ulity, korály, vzácné tropické dřevo – mahagon) (Kučera & Boučková 2010).

Existují i další obecná pravidla, kdy od pohledu můžeme odhadnout, o jaký původ se jedná. Například u rostlin se může jednat o charakteristická poškození listů hmyzem, u zvířat potom o jizvy, s jistým omezením i přítomnost parazitů, jejichž výskyt je v chovatelských zařízeních obvykle potlačován. Postupem času došlo ke zlepšení metod v určování původu a tím tak i k větší přesnosti. V současnosti se jedná hlavně o otisk DNA. V posledních letech se však začínají objevovat stabilní izotopy nejdůležitějších prvků, jako je uhlík, dusík, kyslík, vodík a síra. V následujících letech by mohlo dojít k zapojení dalších izotopů, například těžkých kovů. Izotopová analýza (SIA, Stable Isotope Analyze) má vysoký potenciál využití, ale je potřeba pro analýzu dost času, financí a technické kapacity (Hinsley & Roberts 2018).

## 5. Želvy rodu *Testudo*

Želvy rodu *Testudo* patří k menším suchozemským želvám. Délka jejich krunýře dosahuje 20 – 35 cm. Krunýř je pevný, silně klenutý a v místě mostu je karapax s plastronem pevně srostlý. Přes čelisti dorůstá tvrdá krycí rohovina, jejíž ostré hrany umožňují spásání suché vegetace. Končetiny jsou silné s masivními tupými drápy, jsou uzpůsobené pro kráčení a hrabání na souši. V přirozených podmínkách jsou to druhy převážně býložravé, hrabavé, žijící v lesostepích, stepích a polopouštích mediteránu. Aktivita během roku je mírně odlišná podle lokálních klimatických podmínek. Zimu všechny druhy přežívají zahrabané v zemi a na jaře dochází k intenzivnímu

vykrmení a rozmnožování (páření a kladení vajec). K líhnutí mláďat dochází během léta až podzimu. V oblastech s horkými a suchými léty (nejčastěji střední Asie) se objevuje letní strnulost (aestivace), která může přejít až v zimní spánek (Moravec a kol. 2015).

Výskyt želv rodu *Testudo* je v České republice datován do 18. století, kdy se sem pravděpodobně začaly dovážet pro přípravu pokrmů a kvůli chovu. Během 2. světové války se do Prahy dováželo nejvíce želv, a to jako potravina. Později díky rozvoji cestovního ruchu byly želvy dováženy jako živé suvenýry. Vzhledem k názvosloví, které se používalo do poloviny 20. století, není zcela jasné, jak to bylo s introdukcí. Latinský název *Testudo graeca* byl používán jako označení pro želvy zelenavé. Želvy žlutohnědé pak byly známé jako *Testudo ibera* (Moravec a kol. 2015). Obrázky 7, 8 a 9 ukazují současný areál rozšíření těchto želv.

Pro chov je nejlepší želva zelenavá (*Testudo hermani*). V létě je možné ji chovat venku v zahradách, zimu v přírodě u nás však nepřežívá. Páření a kladení vajec je v našich podmínkách běžné, odchov mláďat ale vyžaduje zásah člověka. V dřívějších dobách byly nálezy těchto želv v přírodě poměrně běžné, a proto ne moc dokumentované. Díky tomu, že jsou nyní želvy *Testudo hermani*, *Testudo graeca* a *Testudo marginata* na seznamu CITES, zvýšila se jejich pořizovací cena, nedochází k tak častému úniku a nálezy jsou tedy vzácnější (Moravec a kol. 2015).



Obrázek 7: Areál rozšíření *Testudo hermanni* v roce 2016 (Speybroeck et al. 2016).



Obrázek 8: Areál rozšíření *Testudo marginata* v roce 2016 (Speybroeck et al. 2016).



Obrázek 9: Areál rozšíření *Testudo graeca* v roce 2016 (Speybroeck et al. 2016).

## 6. Diskuze

Obchodování s ohroženými druhy rostlin, živočichů a produktů z nich není vždy podle pravidel. Odhaduje se, že celosvětový ilegální mezinárodní obchod s živými zvířaty, rostlinami a produkty z nich, je po obchodu se zbraněmi, drogami a lidmi čtvrtou nejvýnosnější komoditou (Brůžek & Kovačiková 2008). Proto je nutné, aby dohlížejíci orgány mohly využívat nějakou spolehlivou metodu, díky které by ověřily, odkud je organismus nebo výrobek z něj doopravdy dovážen. V současnosti je možné využít subjektivního hodnocení vzhledu (například charakteristická poškození vznikající v přírodě), nebo analýzu DNA. Nově se ale začíná objevovat metoda analýzy stabilních izotopů, které jsou obsaženy v každém těle a které korelují s místem, kde organismus rostl (Hinsley & Roberts 2018). Pro analýzu stabilních izotopů můžeme využít různé tkáně z celého těla, pokud se ale jedná o živý chráněný exemplář, není vhodné používat tkáně odebírané destruktivními metodami. V praxi to znamená, že se musí použít ty části těl, které je možné odebrat z exempláře, aniž by došlo k jeho usmrcení.

Izotopový signál tkáně lze v mnoha případech změnit novou stravou. Tato skutečnost zabraňuje dohledání geografického původu po několika letech od změny stravy podle izotopového signálu většiny tkání (van Schingen et al. 2016). Tato změna ale nenastává u tkání, které jsou metabolicky inertní, tedy pouze přirůstají nové části k původním a původní se nemění. Mezi tyto tkáně patří keratin na želvím krunýři, nebo slonovina ve sloních klech (Marques et al. 2011).

Využití metody analýzy stabilních izotopů bylo již vyzkoušeno na několika exemplářích, například želvy rodu *Testudo*, krokodýlovec čínský, krajta a slonovina. Ve většině případů se autoři shodují, že lze tuto analýzu dobře použít v případě, kdy máme stanovené „kalibrační standardy“ izotopových signálů v dané tkáni pro danou oblast (Ziegler et al. 2016, Cerling et al. 2007). Pokud tyto „kalibrační standardy“ nemáme, je vhodnější odhadnout, odkud vzorek zcela jistě nemůže pocházet (Coutu et al. 2016).

K závěru, že izotopové signály není možné dost dobře přepsat, došla Drtinová (2011), která pro svůj experiment využila želvy rodu *Testudo*. Želvy byly rozdělené na dvě skupiny a každá dostávala svou stravu, která měla izotopovým signálem připomínat stravu z Kypru a stravu z ČR. Krmné rostliny byly pěstované vedle sebe. Domnívám se, že zde došlo k ovlivnění izotopového signálu rostlin díky přirozenému koloběhu vody a to tak, že se voda z rostlin se vypařila a jelikož nebyly dostatečně daleko od sebe, došlo k ovlivnění druhé skupiny rostlin (Fry 2006). Při případném opakování experimentu by mělo dojít k zajištění takových podmínek, aby nemohlo dojít k podobnému ovlivňování.

## 7. Závěr

Analýza stabilních izotopů je moderní metoda pro sloužící ke stanovení geografického původu jedinců. Chápání izotopových poměrů v přírodě nám ale nemusí pomoci k přesnému určení původu, pokud se nejedná o místo s charakteristickou anomálií (tedy s poměrem stabilních izotopů, který by byl proti okolí významně vyšší, respektive nižší). Avšak s větší jistotou můžeme zhodnotit, zda je možné, že jedinec pochází opravdu z místa, ze kterého by pocházet měl. Pro soudní praxi je tento důkaz dostačující.

Pro jistější určení geografického původu by bylo vhodné stanovit na základě odběru vzorků v daném místě reálné poměry izotopů. Další možností pro zpřesnění odhadu je využití stabilních izotopů dusíku, jehož izotopový signál je ovlivňován podnebím. Další využití nabízí prvky, které nemusí být obvyklé pro všechny oblasti, nebo se i jejich poměry liší (například těžké kovy). Pokud by došlo k analýze kosti, pak je možné využít stabilní izotopy stroncia, které nahrazují vápník. Ačkoli zatím nelze díky analýze stabilních izotopů přesně určit všechna místa původu, domnívám se, že tato metoda má vysoký potenciál ve využití pro kontrolu obchodování s ohroženými druhy zvířat a rostlin.

## 8. ZDROJE

- Alibardi, L., Toni, M. 2006. Cytochemical, biochemical and molecular aspects of the process of keratinization in the epidermis of reptilian scales. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 40: 73 – 134.
- Alibardi, L. 2005. Proliferation in the epidermis of chelonians and growth of the horny scutes. *Journal Of Morphology*, 265: 52 – 69.
- Brůžek, J., Kovačiková, L. 2008. Stabilní izotopy a bioarcheologie - výživa a sledování migrací v populacích minulosti. *Živa*, 1/2008, 42-45.
- Camin, F., Bontempo, L., Heinrich, K., Horacek, M., Kelly, S. D., Schlicht, C., Thomas, F., Monahan, F. J., Hoogewerff, J., Rossmann, A. 2007. Multi-element (H, C, N, S) stable isotope characteristic of lamb meat from different European regions. *TRACE 3rd Annual Meeting, Greece*.
- Cerling, T. E., Omondi, P., Macharia, A. N. 2007. Diets of Kenyan elephants from stable isotopes and the origin of confiscated ivory in Kenya. *African Journal of Ecology* 45: 614 - 623.
- Coutu, A. N., Lee-Thorp, J., Collins, M. J., Lane, J. P. 2016. Mapping the Elephants of the 19th Century East African Ivory Trade with a Multi-Isotope Approach. *PLoS ONE* 11 (10): e0163606.
- Drtinová, M. 2011. Možnosti určení geografického původu živočišných a rostlinných produktů s pomocí stabilních izotopů kyslíku, vodíku a uhlíku. Izotopový signál keratinu krunýře želv. *Magisterská diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích*.
- Fry, B. 2006. *Stable isotope ecology*. Springer Science, New York.
- Fry, B., Peterson, B. J. 1987. Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*. Volume 18.
- Hinsley, A., Roberts, D. L. 2018. The wild origin dilemma. *Biological Conservation*, 217: 203-206.
- Hobson, K. A., Clark, R. G. 1992. Assessing Avian Diets Using Stable Isotopes II: Factors Influencing Diet-Tissue Fractionation. *The Condor*, Vol. 94, No. 1: 189 - 197.
- Hobson, K. A., Koehler, G. 2015. On the use of stable oxygen isotope ( $\delta^{18}\text{O}$ ) measurements for tracking avian movements in North America. *Ecology and Evolution*, 5 (3): 799 - 806.
- Hobson, K. A., Roth, J. D. 2000. Stable carbon and nitrogen isotopic fractionation between diet and tissue of captive red fox: implications for dietary reconstruction. *Canadian Journal of Zoology*, 78: 848 - 852.

Chamberlain, C. P., Blum, J. D., Holmes, R. T., Feng, X., Sherry, T. W., Graves, G. R. 1997. The use of isotope tracers for identifying populations of migratory birds. *Oecologia*, 109: 132 - 141.

Chamberlain, C. P., Blum J. D., Holmes. R. T., Feng, X., Sherry, T. W., Graves, G. R. 1997. The use of isotope tracers for identifying populations of migratory birds. *Oecologia* 109: 132 - 141.

Kučera, J., Boučková, M. 2010. Úmluva o mezinárodním obchodu ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin. Základní informace se zaměřením na Českou republiku a Evropskou unii. 2. vydání. Ministerstvo životního prostředí, Praha 10.

Kukusamude, Ch., Kongsri, S. 2018. Elemental and isotopic profiling of Thai jasmine rice (Khao Dawk Mali 105) for discrimination of geographical origins in Thung Kula Rong Hai area, Thailand. Volume 91: 357 - 364.

Lemons, G. E., Eguchi, T., Lyon, B. N., LeRoux, R., Seminoff, J. A. 2012. Effects of blood anticoagulants on stable isotope values of sea turtle blood tissue. *Aquatic biology*, 14: 201 - 206.

Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P. 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versis cornification. *Cell Death and Differentiation*, 12: 1497 - 1508.

Matoltsy, A. G. 1976. Keratinization. *The Journal of Investigative Dermatology*, 67: 20-25

Marques, S. T., Tassoni-Filho, M., Ferronato, B. O., Guardia, I., Verdade, L. M., de Camargo, P. B. 2011. Isotopic signatures ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) of muscle, carapace and claw in *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). *Zoologia*, 28 (3):407-410.

McCue, M. D. 2008. Endogenous and Environmental Factors Influence the Dietary Fractionation of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  in Hissing Cockroaches *Gromphadorhina portentosa*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 81 (1): 14 – 24.

Moravec, J. a kol. 2015. Fauna ČR. Plazi - Reptilia. Academia, Praha.

Michner, R., Lajtha, K. 2007. Stable Isotopes in Ecology and Environmental Science. Blackwell Publishong. 2. vydání. Oxford.

Natusch, D. J. D., Carter, J. F., Aust, P. W., Van Tri, N., Tinggi, U., Mumpuni, Riyanto, A., Lyons, J. A. 2017. Serpent's source: Determining the source and geographic origin of traded python skins using isotopic and elemental markers. *Biological Conservation*, 209: 406 414.

Ogden, J. L., Hobson, K. A., Lank, D. B. 2004. Blood isotopic ( $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$ ) turnover and diet tissue fractionation factors in captive dunlin (*Calidris alpina pacifica*). *The Auk*, 121 (1): 170 - 177.



- Rubenstein, D. R., Hobson, K. A. 2004. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 19 (5): 256 - 263.
- Rundel, P. W., Ehleringer, J. R., Nagy, K. A. 1989. *Stable Isotopes in Ecological Research*. Springer-Verlag. New York.
- Schmaltz, L. E., Loonstra, A. H. J., Wymenga, E., Hobson, K. A., Piersma, T. 2018. Quantifying the non-breeding provenance of staging Ruffs, *Philomachus pugnax*, using stable isotope analysis of different tissues. *Ornithol* 159: 191 - 203.
- Speybroeck, J., Beukema, W., Bok, B., Van Der Voort, J. 2016. *Field Guide to the Amphibians Reptiles of Britain and Europe*. Bloomsbury Publishing Plc. London. Page 197-205.
- Streletskiy, A. D., Tananaev, N. I., Opel, T., Shiklomanov, N. I., Nyland, K. E., Streletskaya, I. D., Tokarev, I., Shiklomanov, A. I. 2015. Permafrost hydrology in changing climatic conditions: seasonal variability of stable isotope composition in rivers in discontinuous permafrost. *Environmental Research Letters* 10 095003.
- Struck, U., Altenbach, A. V., Gaulke, M., Glaw, F. 2002. Tracing the diet of the monitor lizard *Varanus mabitang* by stable isotope analyses ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ). *Naturwissenschaften*, 89: 470 - 473.
- Sternberg, L., DeNiro, M. J., Johnson, H. B. 1984. Isotope ratios of cellulose from plants having different photosynthetic pathways. *Plant Physiology*, 74: 557 - 561.
- Šantrůček, J., Šantrůčková, H., Kaštovská, E., Květoň, J., Tahovská, K. 2014. *Stabilní izotopy a jejich použití v biologii a ekologii*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. České Budějovice.
- Valle, L. D., Nardi, A., Toni, M., Emera, D., Alibardi, L. 2009. Beta-keratins of turtle shell are glycine-proline-tyrosine rich proteins similar to those of crocodilians and birds. *Journal of Anatomy*, 214: 284 - 300.
- van Klinken, G. J., van der Plicht, H., Hedges, R. E. M. 1994. Bond  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios reflect paleo – climatic variations. *Geophysical Research Letters*. 21(6): 445 – 448.
- van Schingen, M., Ziegler, T., Boner, M., Streit, B., Nguyen, E. Q., Crook, V., Ziegler, S. 2016. Can isotope markers differentiate between wild and captive reptile populations? A case study based on crocodile lizards (*Shinisaurus crocodilurus*) from Vietnam. *Global Ecology and Conservation*, 6: 232 - 241.
- Wadood, S. A., Guo, B., Liu, H., Wei, S., Bao, X., Wei, Y. 2018. Study on the variation of stable isotopic fingerprints of wheat kernel along with milling processing. *Food Chemistry*, Volume 91: 427 - 433.

Wolf, N., Newsome, S. D., Fogel, M. L., Del Rio, C. M. 2013. The relationship between drinking water and the hydrogen and oxygen stable isotope values of tissues in japanese quail (*Cortunix japonica*). The Auk, 130 (2): 323 - 330.

Wyld, J. A., Brush, A. H. 1979. The molecular heterogeneity and diversity of reptilian keratins. Journal Of Molecular Evolution, 12: 331 – 347.

Yurtsever, Y., Gat, J. A. 1981: Atmospheric waters. In: Gat, J. R. et Gonfiantini, R. (editors.). Stable Isotope Hydrology - Deuterium and oxygen-18 in the water cycle. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, Technical Report Series, 103 – 142.

Ziegler, S., Merker, S., Streit, B., Boner, M., Jacob, D. E. 2016. Towards understanding isotope variability in elephant ivory to establish isotopic profiling and source-area determination. Biological Conservation 197: 154 - 163.

## 8.1.Další zdroje

Zákon 100/2004 Sb., o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi a dalších opatřeních k ochraně těchto druhů a o změně některých zákonů (zákon o obchodování s ohroženými druhy). [On-line] <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-100>.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 709/2010 ze dne 22. července 2010, kterým se mění nařízení Rady (ES) č. 338/97 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi. [On-line] <http://www.ochranaprirody.cz/res/archive/108/014880.pdf?seek=1373450952>.

Nařízení Rady (ES) č. 338/97 o ochraně druhů volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin regulováním obchodu s nimi. [On-line] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A31997R0338>.

www.mzp.cz [on-line] [https://www.mzp.cz/cz/cites\\_obchod\\_ohrozenymi\\_druhy](https://www.mzp.cz/cz/cites_obchod_ohrozenymi_druhy) - údaj o počtu zemí CITES [cit. 6. 8. 2018]

pixnio.com [on-line] <https://pixnio.com/cs/> [cit. 1. 8. 2018]

www.cizp.cz [on-line] <http://www.cizp.cz/Co-je-CITES> [cit. 2. 8. 2018]

www1.lfl.cuni.cz [on-line] <http://www1.lfl.cuni.cz/~kocna/texty/dech.htm> [cit. 6. 3. 2018]

www.iucnredlist.org [on-line] <http://www.iucnredlist.org/details/57287221/0>